

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19073

研究課題名（和文）ピロロキノリンキノン受容体の同定と機能解析：ビタミン様物質の新規生理作用の解明

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of pyrroloquinoline quinone receptors

研究代表者

柴田 貴広（Shibata, Takahiro）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80447838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ビタミン様物質として知られるピロロキノリンキノン（PQQ）により活性化される受容体としてGタンパク質共役型受容体（GPCR）のひとつであるGPR35を見出した。また、クリック反応が可能なPQQ光親和性プローブを作製し、PQQとGPR35が直接結合することを確認した。さらに、ドッキングシミュレーションとGPR35変異体を用いた解析の結果、相互作用に重要なアミノ酸残基を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究は、脱水素酵素に対する補酵素としての役割に関するものばかりであり、PQQが直接結合し活性化される受容体の例はほとんど知られていなかった。本研究で得られた成果は、GPR35を介したPQQの作用機序解明に貢献できるものと期待される。また本研究で作製したPQQ光親和性プローブを用いることにより、タンパク質との相互作用を介したPQQの新規生理作用の解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified GPR35, a G protein-coupled receptor, as an interacting protein with pyrroloquinoline quinone (PQQ), which is known as a vitamin-like compound. Using a clickable photoaffinity probe of PQQ we developed, we confirmed the binding of PQQ to GPR35 in cells. Docking simulations and mutational studies suggested that R240 in GPR35 plays a crucial role in its interaction with PQQ.

研究分野：食品機能化学

キーワード：ピロロキノリンキノン GPCR 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピロロキノリンキノン (PQQ) は、1964 年に細菌のグルコース脱水素酵素中に見出された酸化還元補酵素であり、微生物から哺乳動物まで幅広い生物種において生理活性を示す化合物である (図 1)。1989 年に Killgore らは、PQQ 不含のエサで飼育するとマウスの成長が著しく低下するという事を明らかにした。この研究結果を契機として、ヒトを含む哺乳動物における PQQ の機能が注目され様々な生理作用が報告されるようになり、現在では PQQ がビタミン様物質として位置付けられている。PQQ はその発見の経緯から、微生物における役割を中心に解析が進み、微生物のもつアルコールや糖の脱水素酵素の酸化還元補酵素として作用することが証明されている。また哺乳動物における酵素補因子としての役割についても明らかにされつつあり、PQQ 結合セファロースビーズをアフィニティープローブとして使用することにより、L-乳酸脱水素酵素が PQQ の補酵素として作用することが報告されている。しかしながら、こうした脱水素酵素の補酵素としての機能だけでは説明できない様々な生理作用を PQQ が有しており、その作用機序については十分に理解されているとは言い難い状況であった。研究代表者らは、補酵素-酵素タンパク質としての相互作用ではない、別の様式で PQQ と相互作用するタンパク質が存在すると考え、PQQ と相互作用するタンパク質の探索を通じて、その生理作用の解明を試みることにした。特に、研究代表者らのこれまでの検討結果から、代謝物感受性 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつである GPR3 に焦点を当て、PQQ と GPR35 の関連性を中心に解析を行った。

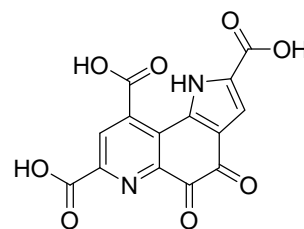


図 1 ピロロキノリンキノン

2. 研究の目的

本研究では、PQQ の新規相互作用タンパク質の探索とその相互作用機構を分子レベルで解析することにより、PQQ の新たな生理作用の解明を目的として研究を実施した。

- (1) PQQ による GPR35 活性化の評価
- (2) PQQ フォトアフィニティープローブを用いた GPR35 との相互作用解析
- (3) ドッキングシミュレーションによる相互作用推定と変異体を用いた解析

3. 研究の方法

(1) GPR35 活性化の評価

GPR35 の活性化は、TGF α (Transforming growth factor α) 切断アッセイを用いて評価した。この方法は、膜型プロテアーゼである TACE (TNF α converting enzyme) の活性化によって、膜結合型 TGF α がエクストドメイン部分で切断され、遊離型 TGF が細胞外へと放出される現象を利用したアッセイ法である。ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に GPR35、共役する G タンパク質、アルカリホスファターゼ融合型 TGF α (AP-TGF α) を過剰発現させ、評価するサンプルを投与した。一定時間後、細胞側と上清側に分け、それぞれに AP の基質である *p*-ニトロフェニルリン酸を添加し、生成した *p*-ニトロフェノールの吸光度をもとに、AP-TGF α 切断量すなわち GPR35 の活性化を評価した。

(2) PQQ フォトアフィニティープローブの作製

PQQ が GPR35 に結合し、直接的に相互作用することを確認するために、光親和性標識法を利用した。PQQ フォトアフィニティープローブの光反応性官能基としてベンゾフェノン、検出用官能基としてクリック反応によりピオチンを導入可能なアルキンを選択した。4-hydroxy-4'-(prop-2-ynyloxy)benzophenone と 2-(2-aminoethoxy)ethanol を出発物質として PEG2-propargyl benzophenone を合成したのち、PQQ とアミド縮合させることにより、クリック反応が可能な PQQ フォトアフィニティープローブを合成した (図 2)。

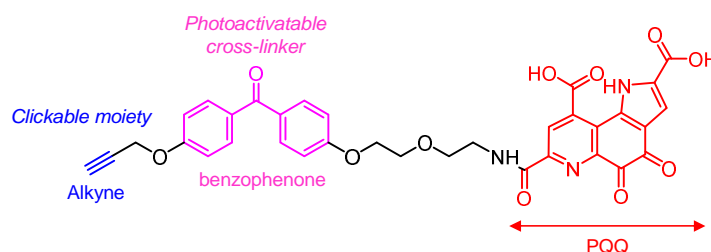


図 2 PQQ フォトアフィニティープローブ

(3) ドッキングシミュレーション

Molecular Research Institute の統合計算科学システム MOE を用いて、PQQ と GPR35 ホモロジーモデルのドッキングシミュレーションを行った。力場パラメーターには Amber 14:EHT を設定した。標準的な水溶液を想定した系として 300K、pH 7.0、塩濃度 0.1 M を設定し、タンパク質に水素原子を付加した後、水素原子の構造最適化を行った。リガンドの配座解析手法には Rotate Bond を指定し、ドッキングには受容体のフレキシビリティを考慮する Induce Fit モードを用いた。最終的なドッキングポーズとして、GBVI/WSA dG (kcal/mol) が最も小さいポーズを選択した。

4. 研究成果

(1) PQQ による GPR35 活性化の評価

TNF α 切断アッセイを用いて 6 種類の代謝物感受性 GPCR (GPR35、GPR40、GPR41、GPR43、GPR119、GPR120) に対する PQQ のリガンド活性を評価したところ、GPR35 を活性化することを見出した (図 3)。GPR35 以外の 5 種類の GPCR に対しては PQQ による活性化は認められなかった。GPR35 の活性化は PQQ の処理濃度依存的であること、また GPR35 に対する選択的アンタゴニストにより活性が抑制されることを確認した。また PQQ の部分構造である pyrrole-2-carboxylic acid、2,4-pyridinedicarboxylic acid、1,2-cyclohexanedione のリガンド活性を評価したところ、いずれの化合物を単独あるいは組み合わせで投与しても GPR35 は活性化しなかった。

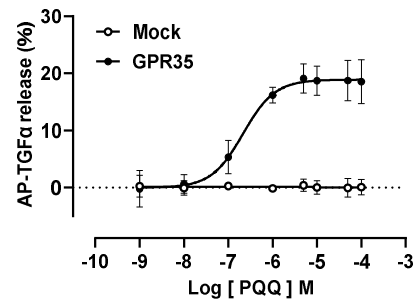


図 3 PQQ による GPR35 の活性化

(2) PQQ フォトアフィニティープローブを用いた GPR35 との相互作用解析

光反応性官能基としてベンゾフェノン、およびクリック反応によりビオチン導入可能なアルキンを有する PQQ フォトアフィニティープローブを作製した。作製したプローブのリガンド活性を TNF α 切断アッセイにより評価したところ、PQQ そのものと同程度の活性を保持していることが確認された。このプローブを用いて、GPR35 を発現させた HEK293 細胞における標識実験を行ったところ、PQQ フォトアフィニティープローブによって GPR35 がラベルされることが確認された。またフォトアフィニティープローブの処理前に PQQ を処理しておくともラベルが消失することから、フォトアフィニティープローブによる GPR35 の標識がリガンド部分である PQQ の構造部分に依存することが示唆された。

(3) ドッキングシミュレーションによる相互作用推定と変異体を用いた解析

PQQ と GPR35 との相互作用に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、GPR35 のホモロジーモデルを作製し、MOE を用いて PQQ とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、PQQ は TM-3-4-5-6 領域のポケットに結合するという結果が得られた。これは既知の GPR35 アゴニストが結合するという報告がなされている領域と同じであった。PQQ の 9 位カルボキシ基は Arg240 と、7 位カルボキシ基は Ser167 と近接しており、イオン性の相互作用が示唆された。そこで、PQQ と Ser172、Arg240 間の相互作用の重要性を検討するために、Ser172 あるいは Arg240 をそれぞれアラニンに置換した S172A、R240A 変異体を作製した。これらの変異体は、wild type の GPR35 と同様に細胞膜上に発現することを確認した。これらの変異体に対する PQQ のリガンド活性を、TGF α 切断アッセイを用いて評価した。その結果、発現受容体によって最大活性は異なったが、wild type の EC50 と比較して、R240A の EC50 は約 19 倍と大きく変化した。以上の検討から、PQQ の GPR35 に対するアゴニスト活性には、Arg240 との相互作用が重要である可能性が示唆された。

本研究では、PQQ により活性化される受容体として GPR35 を見出した。フォトアフィニティープローブを用いた解析から、PQQ が GPR35 に直接結合することを明らかにした。またドッキングシミュレーションと変異体を用いた解析から、PQQ の認識に関与すると考えられる重要なアミノ酸残基を見出した。GPR35 は、胃腸管の恒常性維持や免疫系の調節に関わり、炎症性腸疾患などの病態との関与が示唆されていることから、創薬標的として注目されている。本研究では、PQQ が既知の内因性アゴニストであるキヌレン酸よりも低濃度で GPR35 を活性化することを明らかにした。この知見から、日々の食事あるいはサプリメントからの PQQ 摂取によって、GPR35 が活性化される可能性が考えられる。今後、GPR35 を介した PQQ の生理作用をターゲットとした研究の進展によって、PQQ 摂取による人々の健康増進や疾患予防に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金森 星, 若林 万由香, 下村 沙也子, 服部 浩之, 中島 史恵, 赤川 貢, 井上 飛鳥, 内田 浩二, 柴田 貴広
2. 発表標題 Pyrroloquinoline quinoneによる代謝物感受性受容体GPR35 の活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第193回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金森 星, 若林万由香, 下村沙也子, 服部浩之, 赤川 貢, 井上飛鳥, 内田浩二, 柴田貴広
2. 発表標題 Pyrroloquinoline quinoneにより活性化されるGタンパク質共役型受容体の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田貴広
2. 発表標題 細胞膜受容体を介した食品成分の機能性
3. 学会等名 第35回日本香辛料研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤川 貢 (Akagawa Mitsugu) (70405356)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------